

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公告

## ⑫ 特 許 公 報 (B 2)

平5-44930

⑬ Int. Cl.

A 61 K 37/66

識別記号

A B C G

庁内整理番号

8317-4C

⑭ 公告 平成5年(1993)7月7日

発明の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称  $\gamma$ -インタフェロン ( $\gamma$ -IFN) を含有するリウマチ症治療剤

⑯ 特 願 昭60-188689

⑰ 公 開 昭61-91135

⑱ 出 願 昭60(1985)8月29日

⑲ 昭61(1986)5月9日

優先権主張 ⑳ 1984年10月5日㉑ 西ドイツ(DE)㉒ P3436638.5  
㉓ 1985年6月18日㉔ 欧州特許機構(E.P.)㉕ 85107490.6㉖ 発 明 者 ヨハン フリードリッ ドイツ連邦共和国、デー-7901 ヒュツティシャイム、ハ  
ヒ フォン アイヒボ ムランゲン 6番  
ルン㉗ 発 明 者 フランツ リンク ドイツ連邦共和国、デー-8403 バツド アツバツハ、ア  
ム コーレンシャクト 5番㉘ 発 明 者 ハンス ヨアヒム オ ドイツ連邦共和国、デー-7959 バルグリーデン、バルグ  
ベルト シュトラーセ 3番㉙ 出 願 人 ビオフィエロン ビオヒ ドイツ連邦共和国、デー-7958 ラウプハイム1、インダ  
エミシエ サブスタン ストリエゲビート (無番地)  
ツエン ゲゼルシャフ  
ト ミット ベシュレ  
ンクテル ハフツング  
ウント コムパニー

㉚ 代 理 人 弁理士 浜田 治雄

審 査 官 松 浦 新 司

㉛ 参 考 文 献 特開 昭58-77824 (JP, A) 特開 昭59-134735 (JP, A)

1

2

## ① 特許請求の範囲

1  $\gamma$ -インタフェロンを含有するリウマチ症治療剤。

2 炎症性リウマチ症を治療する特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

3 慢性多発関節炎 (リウマチ様関節炎) を治療する特許請求の範囲第2項記載の治療剤。

4 若年性慢性関節炎を治療する特許請求の範囲第2項記載の治療剤。

5 乾癬性関節炎を治療する特許請求の範囲第2項記載の治療剤。

6 関節外リウマチ症 (軟部リウマチ症) を治療する特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

7 筋肉リウマチ症および上腕肩胛骨関節周囲

炎を治療する特許請求の範囲第6項記載の治療剤。

8 変性リウマチ症を治療する特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

5 9 紅斑性狼瘡を治療する特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

10 10 皮膚筋炎を治療する特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

11 硬皮症を治療する特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

12  $\gamma$ -インタフェロンをヒト細胞によりまたは遺伝子工学的的方法により生産することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の治療剤。13  $\gamma$ -インタフェロン含有治療剤に加え、他

のインタフェロンおよび／または白血球により生成されもしくは遺伝子工学的的方法により生成された他の細胞媒体をも含有することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

14 静脈内、筋肉内、関節内、関節液内、骨膜内、皮下、皮内、莖膜内、口徑的または局部的経路にて投与する投与形態であることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第11項のいずれかに記載の $\gamma$ -インタフェロン含有の治療剤。

15 ポリペプチド治療剤につき知られた投与形態である特許請求の範囲第14項記載の治療剤。

16 投与される個々の投与量が200国際基準単位(I.E.)～2000000I.E.(約20ng～20 $\mu$ gに相当)の $\gamma$ -インタフェロンを含有することを特徴とする特許請求の範囲第1項～第15項のいずれかに記載の $\gamma$ -インタフェロン含有の治療剤。

#### 発明の詳細な説明

〔発明の属する技術分野〕

本発明は、 $\gamma$ -インタフェロンを含有するリユーマチ症治療剤に関するものである。

〔従来技術とその問題点〕

全ての公知インタフェロンは、その構造遺伝子のヌクレオチド配列間のみならず、そのアミノ酸配列間の同族性に基づいて3つの群(すなわち $\alpha$ -IFN、 $\beta$ -IFNおよび $\gamma$ -IFNと呼ばれる3つの群)に明確に分類される。

使用する用語は、ジェー・ビルセク(1983)によりアーチベス・オブ・バイロロジー、第77巻、第283～285頁に開示された「インタフェロン命名委員会」の最新の提案にしたがっている。上記の主たる基準に加え、 $\gamma$ -IFN群を特性化するには、他の両IFN群に対する免疫学的交鎖反応を示さず、かつ $\alpha$ -IFNおよび $\beta$ -IFNと異なりpH2において生物学的に不安定である点を挙げることができる。

$\gamma$ -IFNは免疫系のT-リンパ球による複雑な過程でミトゲンまたは特定抗体での刺激に際し1群の他のファクタ(媒体)と共に放出され、したがって同時にリンホキンとも称せられる。さらに、 $\gamma$ -IFNを構成的に産生する従来存在する同定されたまたは形質転換された細胞ラインは、たとえばエヌ・フジイ等によりジャーナル・イミュノロジー、第130巻、第1683～1686頁およびエー・ツロトニク等によりジャーナル・イミュノ

ジー、第131巻、第794～800頁に記載されている。

ヒト粗製 $\gamma$ -IFNを得るための好適な方法は次のように記載されている。出発物質としては保存血液のリンパ球リッチな血漿フラクション(いわゆる「パツフィーコート」)を使用し、これを集めて600～800 $\mu$ における慎重な遠心分離により血漿残渣から分離する。ペレット化した全白血球を予備加温された媒体中へ細胞5000000個/ $\mu$ lの密度にて懸濁させる。この細胞懸濁物を、それぞれ適当な培養容器においてミトゲン(たとえばフィトヘマグルチニン)およびホルホルエステル(たとえばホルホルミリスチル酢酸)(PMA)の添加後に37 $^{\circ}$ Cにて振とう機で70時間培養する。 $\gamma$ -インタフェロン含有の培養物を遠心分離によつて回収し、これを後に使用するまで4 $^{\circ}$ Cにて貯蔵することができる。通常、このように得られた調製物は約10000国際基準単位の $\gamma$ -IFNを1 $\mu$ l当りに含有する。

$\gamma$ -IFN含有量は、適当な標識細胞(たとえばWISH)におけるCPE-減少試験により試験ウイルス(たとえば、ネズミのEMC)を用いてナショナル・インスティテュート・オブ・ヘルス(USA)の基準法Gg23-901-530にしたがい調製物の抗ウイルス活性として測定される。

$\gamma$ -IFN調製物を得るための他の方法は、ワイ・ケー・イツプ等により「感染および免疫」(1981年10月)第34巻、第131～133頁および米国特許第4376821号、第4376822号および第4460685号各公報に記載されている。

ヒト $\gamma$ -IFN調製物を得るための他の基本的方法は、適当なベクターによりヒト構造遺伝子を異質宿主細胞に組み込むことからなっている。この組換え遺伝子を、構成的にまたは特定誘発剤の添加の後に宿主細胞により発現させる。さらに、誘導されうるアミノ酸配列の合成を必然的にもたらしうような明確に規定されたヌクレオチド配列が構造遺伝子において問題となる場合、 $\gamma$ -IFN分子(すなわち宿主細胞により生成される調製物)は必ずしも天然に生成する $\gamma$ -IFNとは同一でない。「後処理」により特定作用を得る際のこの変動の可能性は、いわゆる蛋白質設計により拡大され、これにより構造遺伝子は化学的または生化学的な完全合成または改変により変化されうる。

ヒト遺伝子を組み込むための宿主細胞として

は、細菌（たとえば、ジー・シモンズ等によりジーン、第28巻、第55-64頁（1984）に記載されたようなイー・コリ）の他に酵母（たとえば、アール・デリンク等によりヌクレイック・アシッド・リサーチ、第11巻、第1819-1837頁（1983）に記載されたようなサツカロミセス・セレビシー）または真核細胞（たとえば、エス・ジェー・スカヒル等によりプロシーディング・アカデミック・サイエンス・USA、第80巻、第4654-4658頁（1983）或いはビー・ダブリュー・グレー等によりネーチャー、第295巻、第503-508頁（1982）に記載されたような支那ハムスターの卵細胞）を使用することができる。

これら幾つかの系において $\gamma$ -IFNは培養液中に1ml当り100000国際基準単位以上の濃度まで濃厚化するか、或いは宿主自身において濃厚化して細胞の蛋白質含有量に対し25%まで蓄積する。

上記方法により得られる $\gamma$ -IFN調製物の濃厚化または精製は、次の方法により個々にまたは組み合わせて行なうことができる：

- 1 調節多孔質ガラス（CPG）またはシリカゲル、
- 2 ゲル濾過（たとえばAcA54またはセファセルS200）、
- 3 イオン交換クロマトグラフィー（CM-セファロースまたはホスフォセルロースまたはDEAE-セルロース）、
- 4 親和性クロマトグラフィー（Con A-セファロースまたはポリ-U-セファロースまたはCu-キレート-セファロース）、
- 5 免疫親和性クロマトグラフィー（抗 $\gamma$ -IFN-セファロース）、
- 6 HPLC（たとえば逆転相物質）。

対応の方法はワイ・ケー・イツプ等によりプロシーディング・ナショナル・アカデミー・サイエンス・USA、第78巻、第1601-1605頁（1981）における「ヒト $\gamma$ （免疫）インタフェロンの部分精製および特性化」に記載され、或いはデー・ノビック等によりEMBOジャーナル、第2巻、第1527-1530頁（1984）またはドイツ特許第3136166 A1号公報に記載されている。

適当な組み合わせにより電気泳動的な均一性まで精製することが可能であり、その際得られる最高の比活性は100000000~200000000国際基準単位で

あり、また平均的数値は10000000~50000000国際基準単位である。蛋白質1mg当り100000~200000000国際基準単位を含有する（すなわち、1 $\mu$ gの活性物質は200000国際基準単位までを含有する）通常の調製物が臨床的に使用される。

他のインタフェロンと同様に、 $\gamma$ -IFNも抗ウイルス、増殖防止および免疫変性の作用を有する物質である。インビトロにおける強力な増殖防止作用に基づき、 $\alpha$ -IFNおよび $\beta$ -IFNと同様に、これは従来殆んど専ら悪性症状を有する患者においてのみ使用された（ビー・イー・ケイムおよびダブリュー・エー・カーター、「インタフェロンおよびその用途」、スプリングー出版、ベルリン・ハイデルベルグ、ニューヨーク、トーキョー（1984）；イー・デマイヤーおよびエッチ・シエレンケン（Hrsg.）、「インタフェロン系の生物学」（1983）、エルセビール・サイエンス出版社、アムステルダム、ニューヨーク、オックスフォード（1983））。

リウマチにおいては運動器管における疼痛および機能障害が問題となる（エッチ・マチエス、「リウマチ質」、グスタフ・フィッシャー出版、ストットガルト、ニューヨーク（1983））。診断-治療-臨床の観点によれば、次のように種々様々である：炎症性リウマチ症、変性リウマチ症および関節外リウマチ症。リウマチ症の病状についてはさらに次のものが挙げられる：全身紅斑性狼瘡、進行性全身硬皮症、皮膚筋炎、結節性動脈周囲炎、尿酸関節炎および石灰性軟骨炎（ダブリュー・ブシレンベル、「クリニツヒエ・ベルテルブーフ」、ワルター・デ・グリッター、ベルリン、ニューヨーク（1982））。炎症性リウマチ症につき挙げられる慢性関節炎の場合、子供や若年層に生ずる形態はしばしば成人におけるものと異なっている（ビー・エム・アンツェル、「若年性慢性多発関節炎」、Arthr.Rheum.Suppl、第20巻、第176-180頁（1977）；エッチ・トルケンプロット、「若年性慢性関節炎およびその亜型」、Münch.med.Wschr.第126巻、第1076-1078頁（1984））。

殆んど大抵のリウマチ症患者の病原は明らかでないで、一般に原因療法は使用できない（ケー・クリーガー、「リウマチ学における新たな治療原理」、Münch.med.Wschr.第126巻、第

1084-1086頁(1984)〕。薬物投与治療においては各種の薬剤が使用され、これらは2つの群に分類することができる。すなわち迅速であるが薬剤が摂取される間のみ作用するたとえばサリチル酸、インドメタシンおよびグルココルチコイドのような対症抗リウマチ剤、および病原を捕えて治療開始後2〜3週間で作用が現われるが、その効果が投薬停止後にも数時間持続する、たとえば金塩、D-ペニシリン、クロロキンおよび免疫抑制剤のような基礎抗リウマチ剤である〔エツチ・マチエス、アール・シー・パトラーおよびデー・エツチ・ゴツドアルト、「リウマチ様関節炎の治療における検討」、ランセット、第ii巻、第278-279頁(1984)〕。

α-IFNを用いて行なわれる治療は、リウマチ様関節炎に対しては無効であった〔エー・カジャンダール等、「リウマチ様関節炎のインタフェロン治療」、ランセット、第i巻、第984頁(1979)〕。この結果は、驚ろくに当たらない。何故なら、リウマチ様関節炎を含め或る種のリウマチ症患者においては、内生インタフェロンが生成され、これは治療上全く作用を示さず、或いはこれら患者の病原につき同罪にさえなりうるからである〔ジュー・ジュー・フックス等、「自家免疫病を有する患者の循環系における免疫インタフェロン」、N.Engl.J.Med、第301巻、第5-8頁(1979)；オー・ティー・ブレブル等、「全身紅斑性狼瘡：酸感受性の異常白血球インタフェロンのヒト血清における存在」、サイエンス、第216巻、第429-431頁(1982)；エム・デグレ等、「リウマチ様関節炎および関連障害における血清および滑液中の免疫インタフェロン」、アニュアル・リウマチティク・デイスカッション、第42巻、第672-676頁(1983)；エー・エム・アービンおよびジュー・ジュー・ミラー、「若年性関節炎を有する患者からの血清および滑液における酸感受性のα-インタフェロン」、アルスリチス・アンド・リウマチズム、第27巻、第582-585頁(1984)；ティー・オー・ローゼンバツハ等、「インタフェロンは実験滑膜炎を惹起し、ヒトにおける自家免疫病を誘発する」、クリニカル・リウマトロジー、第3巻、第361-364頁(1984)〕。

幾つかの臨床検査において、種々のリウマチ症患者の治療に際し、天然γ-インタフェロンの

みならず組換γ-インタフェロンを含有する調製物も少量注射すると疼痛を持続的に除去すると共に、患者の運動性を著しく改善することが予期せずに見い出された。γ-インタフェロンは、炎症性リウマチ症(実施例1〜3)、関節外リウマチ症(実施例4および5)および変性リウマチ症(実施例6)において治療上有効であった。従来臨床上確認されたインタフェロンの作用からは推測されず、かつこの種の病気においてインタフェロンは逆作用があるとも見られていたので、上記効果は驚異的である。

本発明の目的は、γ-インタフェロンを含有するリウマチ症治療剤を提供することである。

〔課題を解決するための手段〕

上記の目的を達成するために、本発明の治療剤は、天然γ-インタフェロン(γ-IFN)および組換γ-IFNからなるγ-インタフェロンを含有する。

天然γ-IFNおよび組換γ-IFNは次のように投与することができる。丸薬として、或いは24時間までの持続灌流としての静脈内投与、筋肉内(脊髄内および関節周囲を含む)、滑液内、関節内、骨膜内、皮下、皮内、莖膜内、経口もしくは局所的な経路で、たとえば軟膏もしくはゲル基剤において皮膚への塗布或いは皮膚中への浸透により投与することができる。これら投与形態において、さらに当業者に周知された投与形態物を使用することもできる。

全ての投与に際し、患者の症状程度にしたがい毎日または数日にわたり1回もしくは数回に分割して、200国際単位(I.E.)〜2000000国際単位の量で投与される。数日間の投与に対しては1回もしくはそれ以上の投与量は次のように投与することができる：

- (a) 毎日連続して、
- (b) 2〜6日間全部、
- (c) 1週間に1回、
- (d) 2〜4週間全部、
- (e) 1ヶ月に1回、または
- (f) 疼痛が発生した都度。

実際の使用については、たとえば20000〜2000000 I.E.(すなわち約2〜200μg)のγ-IFNという少量の投与量による試料から開始することが推奨される。

← α-IFNを1回、  
次回は毎日、

104μg = 1μg

γ-インタフェロン調製物の効果を高めるには、次の物質をさらに添加することができる：

(a) 他のインタフェロンおよび／または白血球により生成されもしくは遺伝子工学法により生成された他の細胞媒体、

(b) 従来治療に使用されている抗リウマチ剤。各種投薬形態物を作成するには、当業者に周知の助剤が使用される。

〔発明の実施例〕

以下、実施例により本発明を説明する。

#### 実施例 1

患者：Lu 男性。

診断：10年間以上にわたる重症の慢性多発関節炎。手および足における変形。臨床検査の際運動性なし。従来疼痛の改善全くなし。

物質：ヒト白血球からのヒトγ-IFN製剤。

投与方法：皮下

療法：

治療日	投与量
1.	$0.1 \times 10^6$ I.E.
2.	$0.5 \times 10^6$ I.E.
3.	$0.5 \times 10^6$ I.E.
4.	$1.0 \times 10^6$ I.E.
5.	$1.0 \times 10^6$ I.E.
8.	$1.5 \times 10^6$ I.E.
9.	$1.5 \times 10^6$ I.E.
10.	$1.5 \times 10^6$ I.E.
11.	$1.5 \times 10^6$ I.E.

結果：治療6日目に下肢における疼痛の相当な改善が示された。治療11日以降、患者は完全に疼痛がなくなった。患者は歩行可能となり、かつ階段を昇ることさえできた。打痛性は消失した。

#### 実施例 2

患者：Zi 男性。

診断：両手における変形を伴う重症の慢性多発関節炎。

物質：ヒト白血球からのヒトγ-IFN製剤。

投与方法：皮下

療法：

治療日	投与量
1.	$0.5 \times 10^6$ I.E.
2.	$0.5 \times 10^6$ I.E.
3.	$0.5 \times 10^6$ I.E.

4.	$0.5 \times 10^6$ I.E.
5.	$0.5 \times 10^6$ I.E.
8.	$1.0 \times 10^6$ I.E.
9.	$1.0 \times 10^6$ I.E.
10.	$1.0 \times 10^6$ I.E.

結果： $0.5 \times 10^6$  I.E.による治療で疼痛の相当な改善な表われ、 $1.0 \times 10^6$  I.E.による治療で患者は完全に疼痛がなくなった。患者は治療の開始に際し最高4分間にわたり車椅子で歩行可能となった。治療9日目以降、2×20分間にわたり可能となった。患者は回復を自覚し、かつもはやコーチソンを必要としなかった。患者は治療開始後17日目に臨床から解放された。この患者は退院日に疼痛がなくなり、その運動性は確実となり、関節にはもはや打痛性が全く存在しなかった。

#### 実施例 3

患者：I.Jä 女性。

診断：血清陰性のリウマチ性多発関節炎。貧血。肝臓の局所的結節増殖。

物質：イー・コリからのヒトγ-IFN製剤。

投与方法：筋肉内

療法：

治療日	投与量
1.	100μg 活性物質
2.	100μg 活性物質
3.	100μg 活性物質
4.	100μg 活性物質
5.	100μg 活性物質
6.	100μg 活性物質
7.	100μg 活性物質
8.	100μg 活性物質
11.	175μg 活性物質
12.	175μg 活性物質
13.	50μg 活性物質
14.	50μg 活性物質

結果：治療初日目に疼痛が強くなった後、患者は治療4日目に初めて疼痛がなくなった。治療をさらに続けると、疼痛はさらに短時間となった。間もなく患者には毎週1回10μgの活性物質を筋肉内注射するようになった。患者はこの薬剤に良好に耐え、それ以来再び疼痛がなくなった。

## 11

## 実施例 4

患者：H.L.女性。

診断：4年間にわたる確実なリウマチ様関節炎。手、腰、膝、踝関節および指関節に疼痛あり。患者は金およびプレドニゾンに対し感受性なし。

物質：イー・コリからのヒト $\gamma$ -IFN製剤。

投与：皮下

投与量：治療開始として毎日2回の250 $\mu$ g。持続治療としての毎日2回の50 $\mu$ g。

結果：治療5日後に患者は疼痛がなくなり、かつ運動性が自由となった。治療を継続すると、リウマチ様関節炎の臨床成績が相当に改善され、かつ持続された。患者は疼痛なしの状態を維持した。

## 実施例 5

患者：W.D.女性。

診断：1週間前から上腕肩甲骨関節周囲炎。

物質：ヒト白血球からのヒト $\gamma$ -IFN製剤。

投与方法および療法：

1日1回皮下 ( $0.5 \times 10^6$  I.E.)

結果：患者は数分間以内に疼痛がなくなった。それ以来、疼痛はもはや生じなかった。

## 実施例 6

## 12

患者：L.L.男性。

診断：座骨神経痛 $L_5/S_1$ 右側。3週間前から骨多孔症。

物質：ヒト白血球からのヒト $\gamma$ -IFN製剤。

5 投与方法：脊椎旁

療法：

治療日

投与量

1.

$0.5 \times 10^6$  I.E.

21.

$0.5 \times 10^6$  I.E.

10 結果：最初の注射以後、患者は5日間にわたり第2回の注射から現在まで（最初の治療日から9ヶ月）疼痛がなかった。

【発明の効果】

従来リウマチ症に適切な治療剤がなかったが、本発明の $\gamma$ -インタフェロンを含有する治療剤により、例えば、リウマチ症患者に少量注射すると疼痛を持続的に除去すると共に、患者の運動性を著しく改善でき、また炎症性リウマチ症（実施例13）、関節外リウマチ症（実施例4および5）、および変性リウマチ症（実施例6）において治療上有効であり、種々のリウマチ症に対して極めて優れた特効的な治療剤が提供出来る。